

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: JOHANN ENGELHARDT  
Serial No.: NOT YET ASSIGNED  
Filed: NOVEMBER 14, 2001  
Title: METHOD AND APPARATUS FOR MEASURING THE  
LIFETIME OF AN EXCITED STATE IN A SPECIMEN



CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119

**Box PATENT APPLICATION**

Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231


Sir:

The benefit of the filing date of prior foreign application No. 100 56 384.8, filed in Germany on November 14, 2000, is hereby requested and the right of priority under 35 U.S.C. §119 is hereby claimed.

In support of this claim, filed herewith is a certified copy of the original foreign application.

Respectfully submitted,

November 14, 2001

  
\_\_\_\_\_  
Jeffrey D. Sanok  
Registration No. 32,169

CROWELL & MORING, LLP  
P.O. Box 14300  
Washington, DC 20044-4300  
Telephone No.: (202) 624-2500  
Facsimile No.: (202) 628-8844



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 56 384.8

**Anmeldetag:** 14. November 2000

**Anmelder/Inhaber:** Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim/DE

**Bezeichnung:** Verfahren und Vorrichtung zur Messung der Lebensdauer eines angeregten Zustandes in einer Probe

**IPC:** G 01 N 21/63

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 14. August 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Heil

**Verfahren und Vorrichtung zur Messung der Lebensdauer eines  
angeregten Zustandes in einer Probe**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Messung der Lebensdauer eines angeregten Zustandes in einer Probe.

- 5 In der Scanmikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von der Probe emittierte Reflexions- oder Fluoreszenzlicht zu beobachten. Der Fokus des Beleuchtungslichtstrahles wird mit Hilfe einer steuerbaren Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Objektebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht  
10 aufeinander stehen, so daß ein Spiegel in x-, der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkipfung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt kommenden Lichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur  
15 Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet.

Speziell in der konfokalen Scanmikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahles in drei Dimensionen abgetastet.

- Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sog.  
20 Anregungsblende - fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlablenkeinrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht  
25 gelangt über die Strahlablenkeinrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden,

hinter der sich die Detektoren befinden. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so daß man eine Punktinformation erhält, die durch sequentielles Abtasten des Objekts zu einem dreidimensionalen Bild führt.

- 5 Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatennahme erzielt.

Die Leistung des vom Objekt kommenden Lichtes wird in festen Zeitabständen während des Abtastvorganges gemessen und so Rasterpunkt für Rasterpunkt abgetastet. Der Messwert muss eindeutig der dazugehörigen Scanposition zugeordnet sein, um aus den Messdaten ein Bild erzeugen zu können. Zweckmäßiger Weise werden hierfür die Zustandsdaten der Verstellelemente der Strahlablenkeinrichtung laufend mitgemessen oder, was allerdings weniger genau ist, direkt die Steuersolldaten der Strahlablenkeinrichtung verwendet.

- 15 Es ist auch möglich in einer Durchlichtanordnung beispielsweise das Fluoreszenzlicht oder die Transmission des Anregungslichtes kondensorseitig zu detektieren. Der Detektionslichtstrahl gelangt dann nicht über die Scanspiegel zum Detektor (Non descscan Anordnung). Für die Detektion des Fluoreszenzlichtes wäre in der Durchlichtanordnung eine kondensorseitige Detektionsblende nötig, um, wie in der beschriebenen Descan-Anordnung, eine dreidimensionale Auflösung zu erzielen. Im Falle der Zweiphotonenanregung kann jedoch auf eine kondensorseitige Detektionsblende verzichtet werden, da die Anregungswahrscheinlichkeit vom Quadrat der Photonendichte abhängt (Proportional Intensität<sup>2</sup>), die naturgemäß im Fokus viel höher ist als in den Nachbarregionen. Das zu detektierende Fluoreszenzlicht stammt daher mit großer Wahrscheinlichkeit zum aller größten Teil aus der Fokusregion, was eine weitere Differenzierung von Fluoreszenzphotonen aus dem Fokusbereich von Fluoreszenzphotonen aus den Nachbarbereichen mit einer Blendenanordnung überflüssig macht.

- 25  
30 Anordnungen, die das Auflösungsvermögen eines konfokalen Rastermikroskops ist unter anderem durch die Intensitätsverteilung und die räumliche Ausdehnung des Fokus des Beleuchtungslichtstrahles gegeben.

Eine Anordnung zur Steigerung des Auflösungsvermögens für Fluoreszenzanwendungen ist aus der PCT/DE/95/00124 bekannt. Hierbei werden die lateralen Randbereiche des Beleuchtungsfokusvolumens mit Laserlicht einer anderen Wellenlänge, das von einem zweiten Laser emittiert wird, beleuchtet, um dort die vom Licht des ersten Lasers angeregten Probenbereiche stimuliert in den Grundzustand zurück zu bringen. Detektiert wird dann nur das spontan emittierte Licht aus den nicht vom zweiten Laser beleuchteten Bereichen, so daß insgesamt eine Auflösungsverbesserung erreicht wird. Für dieses Verfahren hat sich die Bezeichnung STED (Stimulated Emission Depletion) eingebürgert.

In der Mikroskopie werden beispielsweise Proben, die mit Fluoreszenzfarbstoffen präpariert sind, untersucht. Bei der Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe sind sowohl Einphotonenanregung, als auch Mehrphotonenanregung üblich. Oft werden mehrere verschiedene Farbstoffe eingesetzt, die Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlänge abgeben. Die Farbstoffe werden so verwendet, daß sie sich spezifisch an Probenbestandteile anlagern.

Bei Fluoreszenz-Resonanz-Energy-Transfer (FRET) werden Fluoreszenzmoleküle optisch, beispielsweise mit Licht von 488 nm Wellenlänge, angeregt. Das Emissionslicht dieser sog. Donormoleküle, das im Beispielfall eine Wellenlänge von ca. 543 nm aufweisen würde, führt über den sog. Förstertransfer zur Anregung eng benachbarter anderer Moleküle, der Akzeptormoleküle. Der angeregte Zustand der Akzeptormoleküle zerfällt zunächst in einen Zwischenzustand und dann in den Grundzustand unter Emission von Licht von ca. 570 nm Wellenlänge für den Beispielfall. Neben der Anregung der Akzeptormoleküle durch Förstertransfer kann es auch – unerwünschter Weise – zur teilweisen Direktanregung kommen.

Eine von der Konzentration unabhängige Information über die Probe kann die Lebensdauer des angeregten Zustandes der Fluoreszenzfarbstoffe geben. Die Lebensdauer der Fluoreszenzfarbstoffe ist unter anderem von der Beschaffenheit und der Zusammensetzung der Umgebung abhängig. So kann beispielsweise in der Zellbiologie durch Messung der Lebensdauer der

Fluoreszenzfarbstoffe indirekt auf die Kalziumkonzentration in einem Probenbereich geschlossen werden.

Zur Messung der Lebensdauer der angeregten Zustände von Fluoreszenzfarbstoffen haben sich mehrere Methoden etabliert. Diese  
5 Methoden sind in den Kapiteln 4 und 5 des Lehrbuchs von Joseph R. Lakowicz, „Principles of Fluorescence Spectroscopy“, Kluwer Academic/Plenum Publishers, second edition, 1999, ausführlich beschrieben.

Beispielsweise ist es üblich, die Leistung des Anregungslichtes zeitlich zu modulieren, um aus der Phasenverzögerung des Emissionslichtes auf die  
10 Lebensdauer des angeregten Zustandes zu schließen. Es ist auch üblich, die Fluoreszenzfarbstoffe mit kurzen Lichtpulsen anzuregen, um elektronisch den zeitlichen Versatz der Emissionslichtpulse zu messen.

Es gibt Fluoreszenzfarbstoffe, die eine Lebensdauer des angeregten Zustandes von wenigen Nanosekunden oder sogar im Pikosekundenbereich  
15 aufweisen. Mit den bekannten Methoden ist eine solch kurze Lebensdauer nicht messbar; denn auch mit aufwendiger Elektronik ist es nicht möglich, gleichzeitig eine große Zeitauflösung und ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Darüber hinaus ist es bei der erwähnten Modulationsmethode äußerst schwierig, das Anregungslicht hochfrequent zu  
20 modulieren. Selbst mit akusto-optischen Modulatoren können die erforderlichen Frequenzen von mehreren hundert Megahertz oder gar einigen Gigahertz nicht erreicht werden.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Messung der Lebensdauer des angeregten Zustandes einer Probe vorzuschlagen, das  
25 die aufgezeigten Probleme löst.

Ein solches Verfahren ist durch folgende Schritte gekennzeichnet:

- Erzeugen eines Anregungslichtpulses und eines Emissionslichtpulses.
- Beleuchten der Probe mit dem Anregungslichtpuls
- Beleuchten der Probe mit dem Emissionslichtpuls in vorgegebenem  
30 zeitlichen Abstand zum Beleuchten mit dem Anregungslichtstrahl.

- Detektion der Leistung des von der Probe ausgehenden Lumineszenzlichtes.
  - Wiederholen der ersten vier Schritte mit unterschiedlichen zeitlichen Abständen.
- 5 • Ermitteln der Lebensdauer des angeregten Zustandes der Probe aus der Abhängigkeit der Leistung des von der Probe ausgehenden Lumineszenzlichtes von dem zeitlichen Abstand.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Vorrichtung zum Einstellen des zeitlichen Abstandes von Lichtpulsen anzugeben.

10 Eine solche Vorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung eine elektromagnetische Energiequelle, die Licht einer Wellenlänge emittiert, ein Mittel zum Aufteilen des Lichts in mindestens einen ersten und einen zweiten Teillichtstrahl und ein Zwischenelement in mindestens einem Teillichtstrahl zur Beeinflussung der Laufzeit, umfasst.

15 Ein Vorteil der Erfindung ist es, ein Scanmikroskop mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung anzugeben. Dabei wird das Scanmikroskop mit einer Einrichtung zur Erzeugung einer Relativbewegung zwischen einem Beleuchtungslichtstrahl und einer Probe versehen. Zusätzlich ist eine Mikroskopoptik und mindestens ein geeigneter Detektor vorgesehen. Eine  
20 elektromagnetische Energiequelle emittiert Licht, und Mittel zum räumlichen aufteilen sind der elektromagnetischen Energiequelle nachgeschaltet. Ferner ist in mindestens einem Teillichtstrahl ein Zwischenelement zur Beeinflussung der Laufzeit vorgesehen.

Die Erfindung hat den weiteren Vorteil, dass durch den gezielten Einsatz der  
25 stimulierten Emission Techniken und Methoden überflüssig werden, die die Messung einer kurzen Lebensdauer des angeregten Zustandes erschweren oder gar vereiteln.

Die erwähnten Probleme werden auf die exakte Einstellung des zeitlichen Abstandes von Anregungs- und Emissionslichtpuls reduziert. Hierbei ist es  
30 von ganz besonderem Vorteil, wenn eine einzige elektromagnetische Energiequelle vorgesehen ist, deren Licht durch Aufteilen zur Erzeugung des

Anregungslichtpulses und des Emissionslichtpulses dient. In diesem Fall ist die Einstellung des zeitlichen Abstandes durch das Einstellen von Laufzeitunterschieden zwischen den aufgeteilten Lichtwegen gelöst.

5 Mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung kann auch auf einfache Weise festgestellt werden, ob der Förstertransfer in einer für FRET präparierten Probe effizient vor sich geht, nämlich durch Messung der Lebensdauer des angeregten Zustandes des Donors. Wenn sich die Lebensdauer gegenüber der reinen Donorlebensdauer ändert, dann ist ein weiterer Zerfallskanal hinzu gekommen, was deutliche Rückschlüsse auf die Effizienz der FRET-Anregung  
10 zulässt.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben. Dabei zeigen:

- Fig. 1 eine erfindungsgemäße Vorrichtung,  
Fig. 2 ein erfindungsgemäßes Scanmikroskop,  
15 Fig. 3 ein erfindungsgemäßes Scanmikroskop in Non-Descan-Anordnung und Mehrphotonenanregung und  
Fig. 4 einen Ablaufplan des erfindungsgemäßen Verfahrens.

**Fig. 1** zeigt eine erfindungsgemäße Vorrichtung. Als elektromagnetische  
20 Energiequelle 1 ist ein Puls laser vorgesehen, der als Titan:Saphir-Laser ausgeführt ist. Das Licht 3 des Puls lasers wird mit dem Strahlteiler 5 in einen ersten und zweiten Teillichtstrahl 9 und 7 aufgespalten. Der Teillichtstrahl 7 gelangt über den Spiegel 11 zum optisch parametrischen Oszillator 13. Der vom optisch parametrischen Oszillator ausgehende Lichtstrahl 15 wird über  
25 den Spiegel 17 zum dichroitischen Strahlvereiniger 19 geführt, um dort mit Teillichtstrahl 9 vereinigt zu werden. Nach der Strahlteilung am Strahlteiler 5 wird der Teillichtstrahl 9 mit Hilfe von Spiegel 21 auf ein Zwischenelement 23, das z. B. als rechtwinkliges Prisma ausgebildet ist, gelenkt, das so angeordnet ist, dass der Teillichtstrahl 9 an den beiden Kathetenflächen  
30 totalreflektiert wird und Hypotenusenfläche senkrecht durchtritt. Über den Spiegel 25 gelangt der Teilstrahl 9 zum dichroitischen Strahlvereiniger 19. Der

zeitliche Abstand der Lichtpulse im vereinigten Lichtstrahl 27 kann durch Verschieben des Prismas 23 entlang der mit Doppelpfeil 29 angedeuteten Richtungen verändert werden. Das Zwischenelement 23 definiert im optischen Weg des zweiten Teillichtstrahles 7 eine optische Wegverlängerung, die als Schikane 24 bezeichnet ist.

**Fig. 2** zeigt ein erfindungsgemäßes Scanmikroskop, das als konfokales Scanmikroskop ausgeführt ist. Zur Beleuchtung dient die in Fig. 1 gezeigte Vorrichtung; insoweit sind für gleiche Elemente dieselben Bezugszeichen angegeben.

Der vereinigte Lichtstrahl 27 wird von einem Strahlteiler 31 zum Scanmodul 33 reflektiert, das einen kardanisch aufgehängten Scanspiegel 35 beinhaltet, der den vereinigten Lichtstrahl 27 über die Scanoptik 37, die Optik 39 und durch die Mikroskopoptik 41 hindurch über bzw. durch die Probe 43 führt. Der vereinigte Lichtstrahl 27 wird bei nicht transparenten Proben 43 über die Probenoberfläche geführt. Bei biologischen Proben 43 (Präparaten) oder transparenten Proben kann der vereinigte Lichtstrahl 27 auch durch die Probe 43 geführt werden. Dies bedeutet, dass aus verschiedenen Fokusebenen des Objekts nacheinander durch den Lichtstrahl 3 abgetastet werden. Der vereinigte Lichtstrahl 27 ist als durchgezogene Linie dargestellt. Von der Probe ausgehendes Licht 45 gelangt durch die Mikroskopoptik 41 und über das Scanmodul 33 zum Strahlteiler 31, passiert diesen und trifft auf Detektor 47, der als Photomultiplier ausgeführt ist. Das von der Probe 43 ausgehende Licht 45 ist als gestrichelte Linie dargestellt. Im Detektor 47 werden elektrische, zur Leistung des vom Objekt ausgehenden Lichtes 17 proportionale Detektionssignale erzeugt und an eine nicht gezeigte Verarbeitungseinheit weitergegeben. Vor dem Detektor ist ein Bandpassfilter 48 angeordnet, der Licht der Wellenlänge des Lichtstrahles 15 ausblendet. Das bei einem konfokalen Scanmikroskop üblicherweise vorgesehene Beleuchtungspinhole 51 und das Detektionspinhole 49 sind der Vollständigkeit halber schematisch eingezeichnet. Weggelassen sind wegen der besseren Anschaulichkeit hingegen einige optische Elemente zur Führung und Formung der Lichtstrahlen. Diese sind einem auf diesem Gebiet tätigen Fachmann hinlänglich bekannt.

**Fig. 3** zeigt ein erfindungsgemäßes Scanmikroskop in Non-Descan-Anordnung und Mehrphotonenanregung. Zur Beleuchtung dient die in Fig. 1 gezeigte Vorrichtung; insoweit sind für gleiche Elemente dieselben Bezugszeichen angegeben.

- 5 Die Detektion findet bei dieser Ausführung kondensorseitig statt. Das von der Probe 43 ausgehende Licht 55 wird von der Kondensoroptik 53 fokussiert und über den Spiegel 61 zum Detektor 57 geleitet, der als Photomultiplier ausgeführt ist. Vor dem Detektor ist ein Bandpassfilter 59 angeordnet, der Licht der Wellenlänge des Lichtstrahles 15 ausblendet. Die
- 10 Probenbeleuchtung findet analog zu der in Fig. 2 beschriebenen Beleuchtung statt.

- Fig. 4** einen Ablaufplan des erfindungsgemäßen Verfahrens. In einem ersten Schritt erfolgt das Erzeugen 63 eines Anregungslichtpulses und eines Emissionslichtpulses. Hierzu bietet sich die Verwendung von
- 15 modenverkoppelten Pulslasern an, deren Licht in zwei Teilstrahlen aufgespalten wird. Es ist auch möglich zwei Pulslichtquellen einzusetzen. Diese müssen dann jedoch aufeinander synchronisiert die Lichtpulse abgeben. In einem weiteren Schritt erfolgt das Beleuchten 65 der Probe mit dem Anregungslichtpuls. Der Anregungslichtpuls kann sowohl Ein- oder
- 20 Mehrphotonenanregung bewirken. In den folgenden Schritt folgt das Beleuchten 67 der Probe mit dem Emissionslichtpuls in einem vorgegebenem zeitlichen Abstand zum Beleuchten mit dem Anregungslichtpuls. Wenn der Emissionslichtpuls innerhalb der Lebensdauer des angeregten Zustandes auf die Probe trifft, so wird stimulierte Emission bewirkt. Falls der
- 25 Emissionslichtpuls später auf die Probe trifft, so bewirkt er keine stimulierte Emission. In folgenden Schritt erfolgt die Detektion 69 der Leistung des von der Probe ausgehenden Lumineszenzlichtes, wobei das stimuliert emittierte Licht nicht detektiert wird. Wenn stimulierte Emission erfolgt ist, ist die Leistung des Lumineszenzlichtes niedriger, als bei nicht erfolgter stimulierter
- 30 Emission. Zur Ausblendung des stimuliert emittierten Lichtes kann ein Farbfilter, der als Bandfilter ausgeführt ist, verwendet werden. Durch Wiederholen 71 der ersten vier Schritte mit unterschiedlichen zeitlichen Abständen lässt sich die Abhängigkeit der Leistung des von der Probe

ausgehenden Lumineszenzlichtes von dem zeitlichen Abstand von Anregungslichtpuls und Emissionslichtpuls bestimmen. Im letzten Schritt erfolgt das Ermitteln 73 der Lebensdauer des angeregten Zustandes der Probe aus der Abhängigkeit der Leistung des von der Probe ausgehenden

5 Lumineszenzlichtes von dem zeitlichen Abstand. Der kürzeste zeitliche Abstand, bei der gerade keine stimulierte Emission stattfindet, entspricht der Lebensdauer des angeregten Zustandes.

Die Erfindung wurde in bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und

10 Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

**Bezugszeichenliste:**

	1	elektromagnetische Energiequelle
	3	Licht
5	5	Strahlteiler
	7	zweiter Teillichtstrahl
	9	erster Teillichtstrahl
	11	Spiegel
	13	Element zur Wellenlängenänderung
10	15	Lichtstrahl
	17	Spiegel
	19	dichroitischer Strahlvereiniger
	21	Spiegel
	23	Zwischenelement
15	24	Schikane
	25	Spiegel
	27	Beleuchtungslichtstrahl
	29	Doppelpfeil
	31	Strahlteiler
20	33	Scanmodul
	35	Scanspiegel
	37	Scanoptik
	39	Optik
	41	Mikroskopoptik
25	43	Probe
	45	ausgehendes Licht

	47	Detektor
	48	Bandpassfilter
	49	Detektionspinhole
	51	Beleuchtungspinhole
5	53	Kondensoroptik
	55	Licht
	57	Detektor
	59	Bandpassfilter
	61	Spiegel
10	63	Erzeugen
	65	Beleuchten
	67	Beleuchten
	69	Detektion
	71	Wiederholen
15	73	Ermitteln

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Messung der Lebensdauer eines angeregten Zustandes in einer Probe, gekennzeichnet durch folgende Schritte:
  - 5 • Erzeugen (63) eines Anregungslichtpulses und eines Emissionslichtpulses.
  - Beleuchten (65) der Probe mit dem Anregungslichtpuls
  - Beleuchten (67) der Probe mit dem Emissionslichtpuls in vorgegebenem zeitlichen Abstand zum Beleuchten mit dem Anregungslichtpuls.
  - 10 • Detektion (69) der Leistung des von der Probe ausgehenden Lumineszenzlichtes.
  - Wiederholen (71) der ersten vier Schritte mit unterschiedlichen zeitlichen Abständen.
  - Ermitteln (73) der Lebensdauer des angeregten Zustandes der Probe in Abhängigkeit der Leistung des von der Probe ausgehenden Lumineszenzlichtes und dem zeitlichen Abstand.
  - 15
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Anregungslichtpuls mit einem Puls laser und der Emissionslichtpuls mit einem weiteren Puls laser erzeugt wird.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Puls laser aufeinander synchronisiert sind.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Anregungslichtpuls und der Emissionslichtpuls von einem einzelnen Puls laser erzeugt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen weiteren Schritt,
  - 5 • Verringern der Energie des Emissionslichtpulses im Verhältnis zur Energie des Anregungslichtpulses.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das mit einem optisch parametrischen Oszillator erreicht wird, der im Strahlengang des Emissionslichtpulses vorgesehen ist.
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Lumineszenz um Fluoreszenz handelt.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Probe um ein mit Fluoreszenzfarbstoffen versehene mikroskopisches Präparat handelt.
- 15 9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Licht der Wellenlänge des Emissionslichtpulses nicht detektiert wird.
10. Vorrichtung zur Messung der Lebensdauer eines angeregten Zustandes in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung eine elektromagnetische Energiequelle (1), die Licht (3) einer Wellenlänge emittiert, ein Mittel (5) zum Aufteilen des Lichts (3) in mindestens einen ersten und einen zweiten Teillichtstrahl (7, 9) und ein Zwischenelement (23) in mindestens einem Teillichtstrahl zur Beeinflussung der Laufzeit, umfasst.
- 20 11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Teillichtstrahl (9) einen Anregungslichtstrahl auf eine Probe (43) gerichtet ist und dort einen definierten Teilbereich anregt.
- 25

12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der zweite Teillichtstrahl (7), der einen Emissionslichtstrahl definiert und derart auf die Probe (43) gerichtet ist, dass der Teilbereich der Probe (43) zumindest teilweise überdeckt wird.
- 5    13. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Zwischenelement (23) die Länge des optischen Lichtweges verändert.
14. Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Zwischenelement (23) bewegbar ausgestaltet ist und dadurch eine Schikane (24) mit einer einstellbaren Durchlauflänge definiert.
- 10    15. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass in einem Teillichtstrahl (7, 9) ein Element (13) zur Wellenlängenänderung vorgesehen ist.
- 15    16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Element (13) zur Wellenlängenänderung ein optisch parametrischer Oszillator ist.
17. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Element (13) zur Wellenlängenänderung ein Element zur Frequenzvervielfachung ist.
- 20    18. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregung eine Mehrphotonenanregung ist.
19. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die elektromagnetische Energiequelle (1) ein Laser ist.
20. Vorrichtung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die elektromagnetische Energiequelle (1) ein Pulslaser ist.
- 25    21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung in dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 verwendbar ist.

22. Scanmikroskop mit einer Einrichtung zur Erzeugung einer Relativbewegung zwischen einem Beleuchtungslichtstrahl (27) und einer Probe (43), einer Mikroskopoptik (41) und einem Detektor (47), dadurch gekennzeichnet, dass das Scanmikroskop eine Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 21 beinhaltet.
- 5

### Zusammenfassung

5 Eine Vorrichtung zur Messung der Lebensdauer eines angeregten Zustandes in einer Probe ist offenbart. Die Vorrichtung umfasst eine elektromagnetische Energiequelle (1), die Licht (3) einer Wellenlänge emittiert. Ferner ist ein Mittel (5) zum Aufteilen des Lichts (3) in mindestens einen ersten und einen zweiten Teillichtstrahl (7, 9) und ein Zwischenelement (23) in mindestens einem Teillichtstrahl zur Beeinflussung der Laufzeit, vorgesehen.

Fig. 1

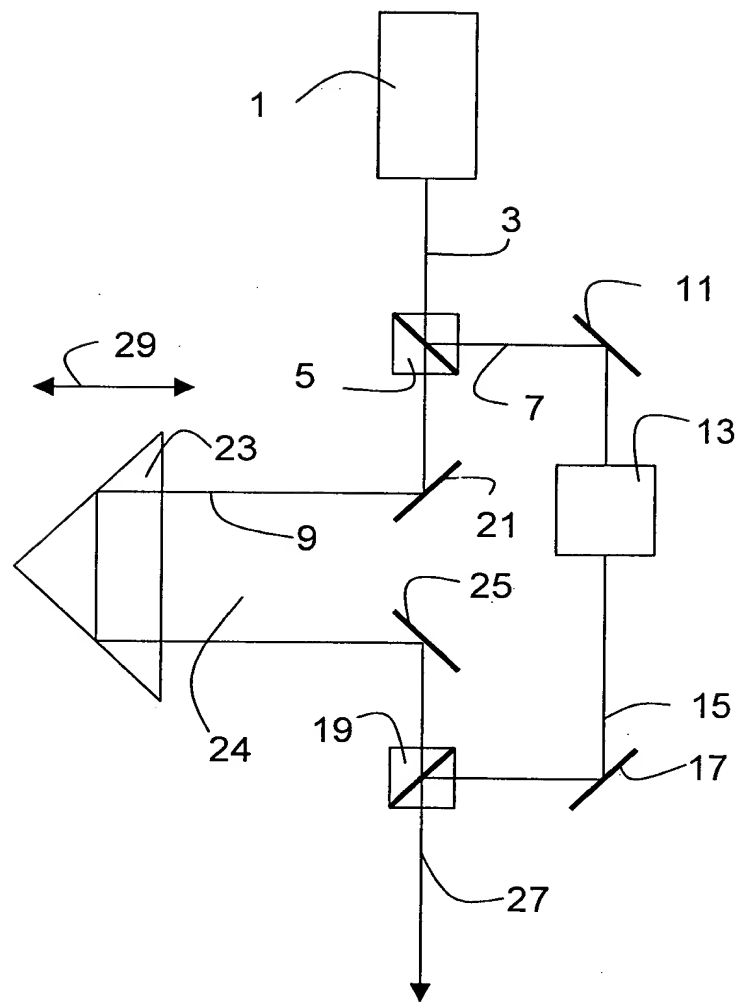


Fig. 1

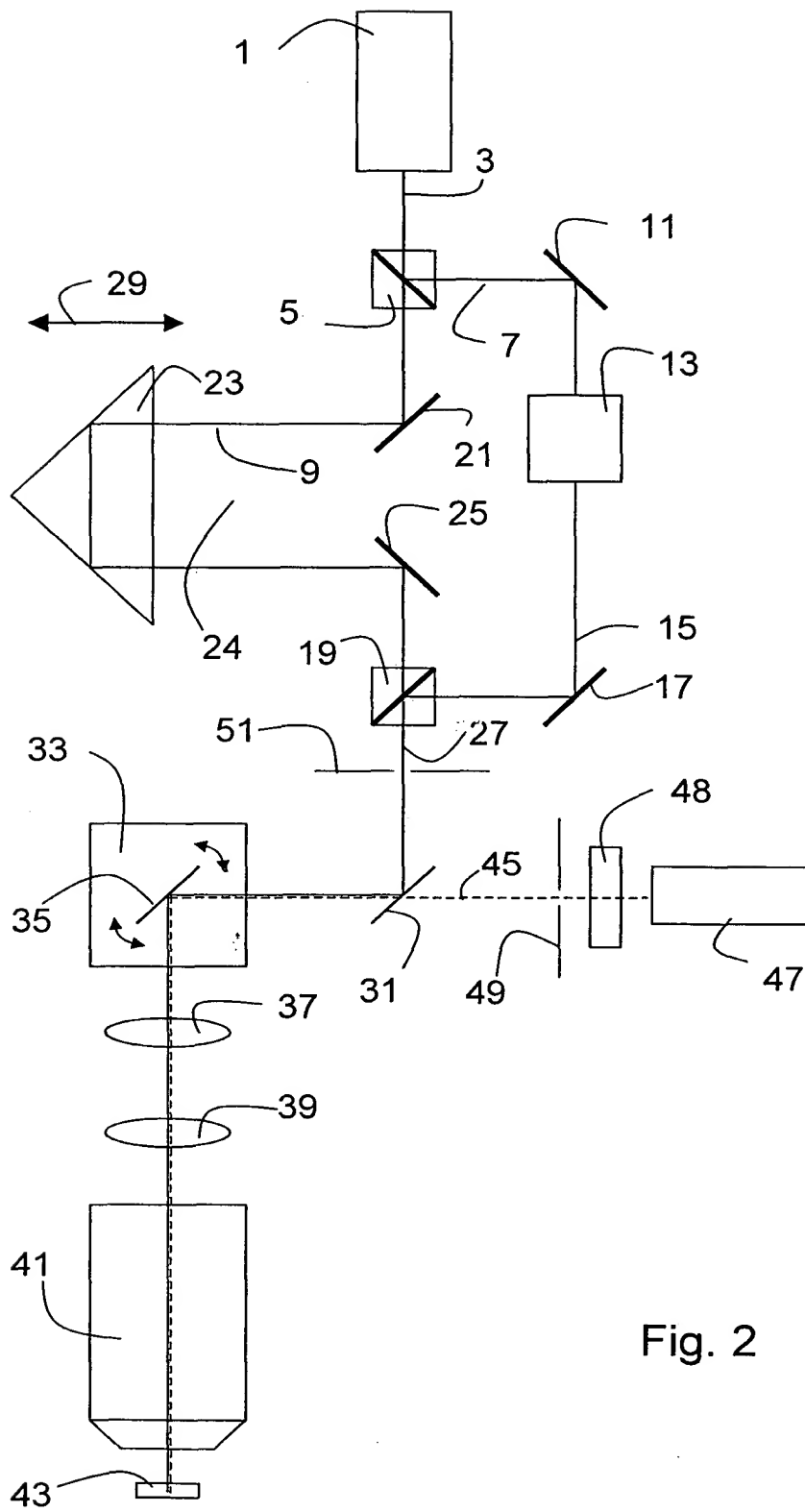


Fig. 2

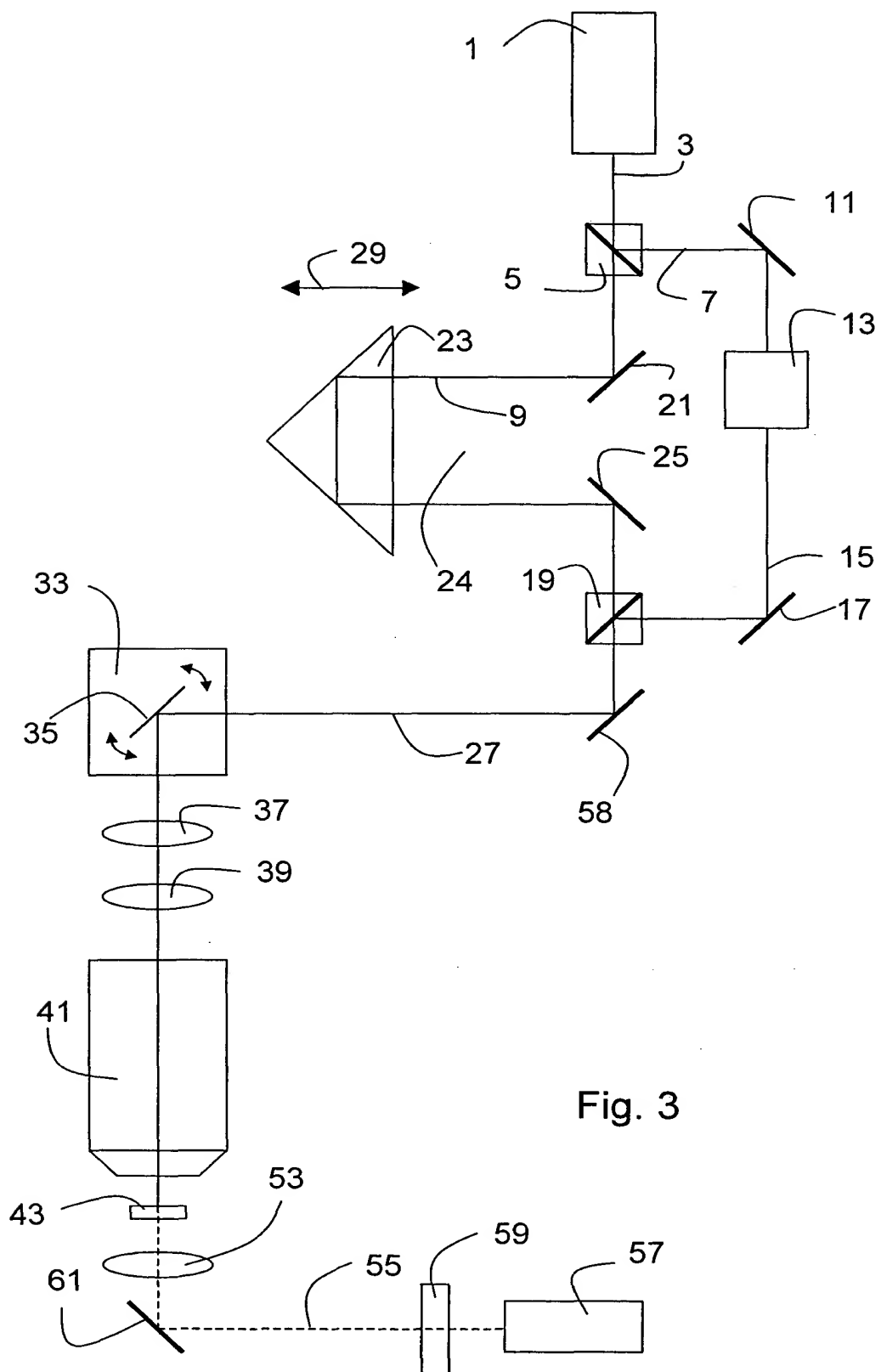


Fig. 3

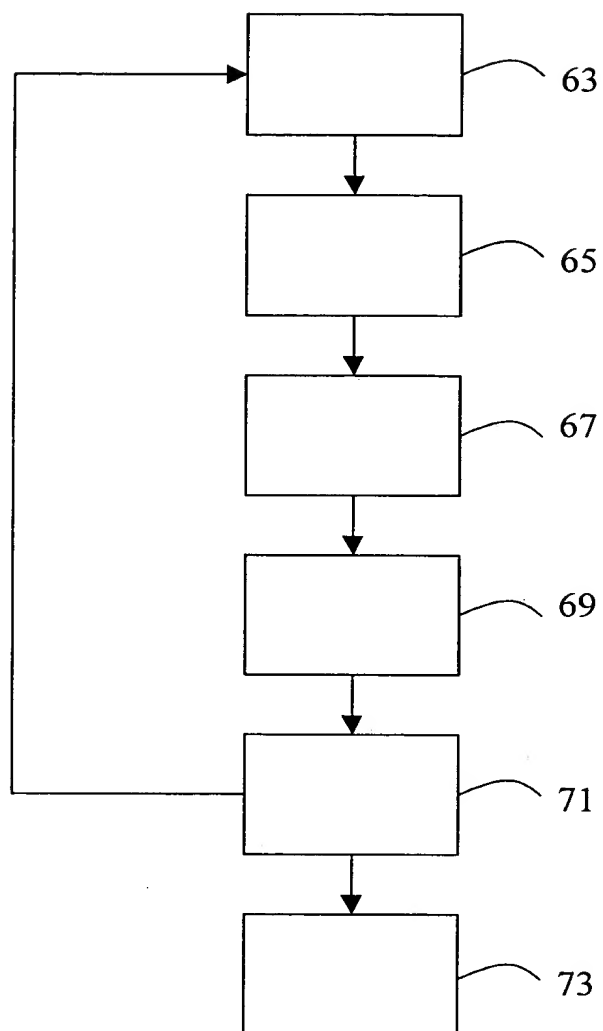


Fig. 4